

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 7 月 24 日 (24.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/060125 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 14/47, 19/00, C12N 1/21 // (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/00113
- (22) 国際出願日: 2003 年 1 月 9 日 (09.01.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-5180 2002 年 1 月 11 日 (11.01.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山田 隆央 (YAMADA, Takao) [JP/JP]; 〒580-0003 大阪府 松原市 一津屋 4 丁目 3 番 2 6 号 Osaka (JP). 辻 勇 (TSUJI, Isamu) [JP/JP]; 〒562-0045 大阪府 箕面市 瀬川 5 丁目 1 6 番 5-507 Osaka (JP). 三角 裕子 (MISUMI, Yuko) [JP/JP]; 〒666-0037 兵庫県 川西市 松が丘町 6-3 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING KiSS-1 PEPTIDE

(54) 発明の名称: K i S S - 1 ペプチドの製造法

(57) Abstract: KiSS-1 peptide or its salt can be industrially produced on a large scale by subjecting a fused protein or peptide, which has KiSS-1 peptide ligated to the N-end of a low-molecular weight peptide having cysteine at the N-end, to a reaction of cleaving the peptide bond in the amino acid side of the cysteine residue.

(57) 要約:

N 末端にシステインを有する低分子ペプチドの N 末端に K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをシステイン残基のアミノ酸側のペプチド結合の切断反応に付すことにより、K i S S - 1 ペプチドまたはその塩を工業的かつ大量に製造することができる。

明 細 書

K i S S - 1 ペプチドの製造法

5 技術分野

本発明は、N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはポリペプチドを製造し、次いで該融合蛋白質またはポリペプチドをペプチド結合の切断反応に付すことにより、K i S S - 1 ペプチドまたはその塩を製造する方法に関する。

10

背景技術

遺伝子組換え技術を用いて、ペプチドを製造するに際しては、ペプチドが細胞内で、分解を受けやすいために、融合蛋白質の形で発現させることがしばしば行なわれている。融合蛋白質からの目的ペプチドの切り出しには、プロムシアンを用い化学的に切断する方法（イタクラら、*Science*, 198, 1056(1977))、ファクターXaを用い酵素的に切断する方法（ナガイら、*Methods in Enzymology*, 153, 46(1987)) が知られている。

さらに、蛋白質中のペプチド結合を切断する方法として、2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸によるアシルシステイン結合の切断が知られている（「生化学実験講座」1，タンパク質の化学II，日本生化学会編，東京化学同人発行，第247～250頁1976年）。しかしながら、蛋白質からの目的ペプチドの切り出しについては、開示されていない。

WO 00/24890号およびWO 01/75104号には、本発明で用いられるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩が開示されている。

25 WO 01/44469号には、N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK i S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法が開示されており、N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドとして、イ

- ンターフェロン類、インターロイキン類、線維芽細胞成長因子（a F G F、b F G F）等各種成長因子類、（プロ）ウロキナーゼ類、リンホトキシン、Tumor Necrosis Factor（T N F）、 β -ガラクトシターゼなどの酵素タンパク類、貯蔵タンパク類、ストレプトアビシン、プロテインA、プロテインG、Tissue Plasminogen Activator（T P A）、これらのムテイン又はこれらの一部（断片）が例示されている。

- 従来知られている技術において、融合蛋白質からの目的ペプチドの切り出しに際し、ブロムシアンを用いる場合には、メチオニンを含有するペプチドの製造には適用することはできないし、切り出し時の収率等に問題が多い。
- 10 このように、融合蛋白質またはポリペプチドから目的とするペプチドを効率良く切り出す方法が望まれている。

発明の開示

- 本発明者らは、新規生理活性ペプチドであるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩を効率良く製造する方法について鋭意検討を加えたところ、N末端にシステインを有する低分子のペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはポリペプチドを製造し、次いでこれをペプチド結合を切断する反応に付すことにより、K i S S - 1 ペプチドまたはその塩を効率良く製造できることを見出した。

- 20 すなわち、本発明は、
- （1）N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK i S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法、
- 25 （2）N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを有するベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を発現させ、発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK

i S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法、

(3) 製造されるK i S S - 1 ペプチドのC末端がアミドである上記(1) または(2) 記載の製造法、

(4) 切断反応がS - シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解
5 反応に付す反応である上記(1) または(2) 記載の製造法、

(5) K i S S - 1 ペプチドが配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列を含有
するペプチドである上記(1) または(2) 記載の製造法、

(6) K i S S - 1 ペプチドが、①配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列の
N末端から第40～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチド、②配
10 列番号: 1 で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目からなる
アミノ酸配列を有するペプチド、③配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列の
N末端から第46～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチドまたは
④配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目から
なるアミノ酸配列を有するペプチドである上記(1) または(2) 記載の製
15 造法、

(7) N末端にシステインを有する低分子ペプチドが、N末端にシステイン
を有し、約10～約50個のアミノ酸残基からなるペプチドである上記(1)
または(2) 記載の製造法、

(8) 低分子ペプチドが、K i S S - 1 ペプチドを含む前駆体蛋白質のC末
20 端側の部分ペプチドであって、該K i S S - 1 ペプチドのC末端アミノ酸に
隣接するアミノ酸残基から始まるアミノ酸配列を有するペプチドである上記
(1) または(2) 記載の製造法、

(9) N末端にシステインを有する低分子ペプチドが、配列番号: 3 で表さ
れるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加したペプチ
25 ドである上記(1) または(2) 記載の製造法、

(10) N末端にシステインを有する低分子ペプチドが配列番号: 3 で表さ
れるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加したペプチ
ドであり、K i S S - 1 ペプチドが配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列を
有するペプチドであり、製造されるK i S S - 1 ペプチドのC末端がアミド

である配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記

(1) または (2) 記載の製造法、

(11) N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、K i S S
- 1 ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩、

- 5 (12) 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有する上記(11)記載の融合蛋白質、ペプチドまたはその塩、

(13) 上記(11)記載の融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを含有するDNA、

- 10 (14) ①配列番号：6で表される塩基配列または②配列番号：7で表される塩基配列を有する上記(13)記載のDNA、

(15) 上記(13)記載のDNAを有するベクター、

(16) 上記(15)記載のベクターを含有する形質転換体、および

(17) FERM BP-7823で表示されるエシュリヒア・コリMM2
94 (DE3) / pTC2MetC24-1.3を提供する。

- 15 さらに、本発明は、

(18) 次の①～④の工程；

①N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端システインに、K i
S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNA
を作製する、

- 20 ②該DNAを有するベクターを作製する、

③該ベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたは
その塩を発現させる、

④発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミ
ノ基側のペプチド結合の切断反応に付す、

- 25 からなる第(2)項記載の製造法、

(19) N末端にシステインを有する低分子ペプチド(ここで低分子ペプチ
ドとは、目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドをいう)
のN末端に、目的成熟ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその
塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを

特徴とする目的成熟ペプチドまたはその塩の製造法、

- (20) N末端にシステインを有する低分子ペプチド（ここで低分子ペプチドとは、目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドをいう）のN末端に、目的成熟ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを有するベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、
5 ペプチドまたはその塩を発現させ、発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とする目的成熟ペプチドまたはその塩の製造法、

- (21) 切断反応がS-シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解反応に付す反応である上記(19)または(20)記載の製造法、
10

(22) 目的成熟ペプチドが約10～100個のアミノ酸残基を含有するペプチドである上記(19)または(20)記載の製造法、

- (23) N末端にシステインを有する低分子ペプチドが、N末端にシステインを有し、約10～約50個のアミノ酸残基からなるペプチドである上記(19)または(20)記載の製造法、
15

(24) N末端にシステインを有する低分子ペプチド（ここで低分子ペプチドとは、目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドをいう）のN末端に、目的成熟ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩、

- (25) 上記(24)記載の融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを含有するDNA、
20

(26) 上記(25)記載のDNAを有するベクター、

(27) 上記(26)記載のベクターを含有する形質転換体、および

(28) 次の①～④の工程；

- 25 ①N末端にシステインを有する低分子ペプチド（ここで低分子ペプチドとは、目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドをいう）のN末端システインに、目的成熟ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを作製する、
②該DNAを有するベクターを作製する、

- ③該ベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を発現させる、
- ④発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付す、
- 5 からなる第(20)項記載の製造法を提供する。

図面の簡単な説明

- 図1は実施例1で用いられたDNAフラグメントを示す。
- 図2は実施例1で得られたプラスミドpTC2MetC24の構築図を示す。
- 10 図3は実施例5で得られたプラスミドpTC2MetC24の構築図を示す。

発明を実施するための最良の形態

- 本発明の方法に用いられるKiSS-1ペプチドとしては、例えばWO00/24890号に記載のヒトKiSS-1ペプチド、WO01/75104号に記載のマウスまたはラットKiSS-1ペプチドが用いられる。
- 15

ヒトKiSS-1ペプチドとしては、具体的には、本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドなどがあげられる。

- 20 「本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチド」としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、かつ8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドであればいかなるものであってもよいが、ペプチド活性（例えば、ペプチドと受容体の結合活性、ペプチドによって引き起こされる受容体発現細胞の細胞刺激活性など）などが、実質的に同じであることを意味する。具体的には、①本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるペプチド、②本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、8乃至
- 25

15個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられる。

より具体的には、ヒトK i S S - 1 ペプチドとしては、①本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるペプチド、②本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第40～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、③本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、④本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第46～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、⑤本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチドなどがあげられる。

マウスK i S S - 1 ペプチド (A) としては、例えば、①配列番号：16で表されるアミノ酸配列のN末端から第134～141番目のアミノ酸配列を含有し、8ないし52個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられ、具体的には、①配列番号：16で表されるアミノ酸配列のN末端から第90～141番目のアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：16で表されるアミノ酸配列のN末端から第132～141番目のアミノ酸配列を有するペプチド、③配列番号：16で表されるアミノ酸配列のN末端から第127～141番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

マウスK i S S - 1 ペプチド (B) としては、例えば、配列番号：17で表されるアミノ酸配列のN末端から第138～145番目のアミノ酸配列を含有し、8ないし52個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられ、具体的には、配列番号：17で表されるアミノ酸配列のN末端から第94～145番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

ラットK i S S - 1 ペプチドとしては、例えば、配列番号：18で表されるアミノ酸配列のN末端から第112～119番目のアミノ酸配列を含有し、8ないし52個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられ、具体的には、①配列番号：18で表されるアミノ酸配列のN末端から第68～119番目のアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：18で表されるアミノ酸配列のN末端から第110～119番目のアミノ酸配列を有するペプチド、

③配列番号：18で表されるアミノ酸配列のN末端から第105～119番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどが挙げられる。

上記KiSS-1ペプチドは、WO00/24890号またはWO01/75104号に記載のレセプター蛋白質OT7T175に対し、リガンド活性を有する。

本明細書におけるペプチドはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表されるペプチドのC末端は、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）、カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アルキルアミド（ $-\text{CONHR}$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。エステルまたはアルキルアミドのRとしては、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキルなどの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などがあげられる。

さらに、KiSS-1ペプチドには、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のKiSS-1ペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては

例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- 5 本発明の方法に用いられるN末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドとしては、特定されるものではない。そのN末端にシステインを有しない蛋白質またはペプチドの場合は、自体公知の方法によりN末端にシステインを有するようにすればよい。

- 10 該N末端にシステインを有する低分子ペプチドの「低分子ペプチド」としては、例えば約10～50個、好ましくは約20～40個、さらに好ましくは約20～30個アミノ酸残基を有するものが好ましい。なかでも、①配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するヒトKiSS-1ペプチド前駆体（例えば、J. Natl. Cancer Inst., 88, 1731, 1996; WO 98/39448号）の部分ペプチド、②配列番号：16で表されるアミノ酸配列を含有するマウスKiSS-1ペプチド前駆体（A）（WO 01/75104号）の部分ペプチド、③配列番号：17で表されるアミノ酸配列を含有するマウスKiSS-1ペプチド前駆体（B）（WO 01/75104号）の部分ペプチド、④配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するラットKiSS-1ペプチド前駆体（WO 01/75104号）の部分ペプチドなどが用いられ、なかでもこれらKiSS-1ペプチド前駆体のC末端側の部分ペプチドが好ましい。より好ましくは、低分子ペプチドとしては、KiSS-1ペプチドを含む前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドであって、該KiSS-1ペプチドのC末端アミノ酸に隣接するアミノ酸残基から始まるアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

- 25 より具体的には、該低分子ペプチドとしては、例えば、
（1）KiSS-1ペプチドがヒトKiSS-1ペプチドである場合は、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有する、ヒトKiSS-1ペプチド前駆体のC末端側の部分ペプチドなどが、
（2）KiSS-1ペプチドがマウスKiSS-1ペプチド（A）である場

合は、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列のN末端から第142～152番目のアミノ酸配列を有する、マウスKiSS-1ペプチド前駆体のC末端側の部分ペプチドなどが、

(3) KiSS-1ペプチドがマウスKiSS-1ペプチド(B)である場合は、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列のN末端から第146～156番目のアミノ酸配列を有する、マウスKiSS-1ペプチド前駆体のC末端側の部分ペプチドなどが、

(4) KiSS-1ペプチドがラットKiSS-1ペプチドである場合は、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列のN末端から第120～130番目のアミノ酸配列を有する、ラットKiSS-1ペプチド前駆体のC末端側の部分ペプチドなどが好ましく用いられる。

本発明の方法においては、これらの低分子ペプチドのN末端にシステインが連結している。

本発明方法で用いられる融合蛋白質(融合ペプチドを含む)をコードするDNAは、(1)全塩基配列を化学的に合成してもよいし、(2)低分子ペプチドをコードする塩基配列のN末端側にシステインをコードする塩基配列を配置し、さらにそのN末端側にKiSS-1ペプチドをコードする塩基配列を配置することにより該DNAを構築してもよい。また、(3)該ペプチドのフラグメントを得るのが目的の場合には、所望のフラグメントの直後のアミノ酸残基をsite-directed mutagenesis等の手法でシステインに置換した該DNAを構築すればよい。

上記の(1)の場合の製造法としては、例えば、自体公知のホスホアミダイド法、リン酸トリエステル法、ジエステル法、ハイドロジェンホスホネート法などを用いて、短いものなら一度に、長いものでは分割して合成した後にT4DNAリガーゼを用いて連結して作成することが可能である。

上記の(2)の場合の製造法としては、例えば、C末端側の蛋白質をコードするDNAは、染色体またはcDNAから適当な制限酵素で切断し、ベクターに連結して得るか、もしくはcDNAを取得する。しかる後にN末端がシステインになるように制限酵素で切断するか、もしくは、合成DNAを全蛋白

もしくはその一部の遺伝子の5'-末端に結合しN末端がシステインになるように改変する。その5'-末端に目的の蛋白質をコードするDNA(化学合成したものでも、生体よりクローニングしてきたものでもよい)をつなげる。

このようにして得られる融合蛋白質をコードするDNAの具体例としては、

5 例えば式

GGTACTTCTCTGTCTCCGCCGCCGAATCTTCTGGTTCTCGTCAGCAGCCGGTCTGTCTGCTCCGCACT
CTCGTCAGATCCCGGCTCCGCAGGGTGCTGTTCTGGTTTCAGCGTGAAAAAGACCTGCCGAACCTACAACCTG
GAACCTCTTTCGGTCTGCGTTTC (配列番号：2) -TGC または TGT-R (I)

〔式中、Rは配列番号：4で表わされる塩基配列を示す。〕で表わされる塩
10 基配列(配列番号：6または7)を含有するDNAなどがあげられる。

上記式(I)はヒトKiSS-1ペプチドを含有するペプチドをコードするDNA塩基配列(配列番号：2)にシステインをコードする塩基配列(TGCまたはTGT)を介してRで示される塩基配列(配列番号：4)が結合していることを示す。

15 ヒトKiSS-1ペプチドをコードするDNAは、上記式(I)で表されるDNAや配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するヒトKiSS-1ペプチド前駆体をコードするDNAまたはその改変DNA(例えば、J. Natl. Cancer Inst., 88, 1731, 1996; WO 98/39448号)を用いて、自体公知の方法に従って製造することもできる。

20 マウスKiSS-1ペプチドをコードするDNAは、配列番号：16で表されるアミノ酸配列を有するマウスKiSS-1ペプチド前駆体(A)をコードするDNA(配列番号：19)またはその改変DNA(WO 01/75104号)や配列番号：17で表されるアミノ酸配列を有するマウスKiSS-1ペプチド前駆体(B)をコードするDNA(配列番号：20)または
25 その改変DNA(WO 01/75104号)を用いて、自体公知の方法に従って製造することができる。

ラットKiSS-1ペプチドをコードするDNAは、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を有するラットKiSS-1ペプチド前駆体をコードするDNA(配列番号：21)またはその改変DNA(WO 01/75104

号)を用いて、自体公知の方法に従って製造することができる。

5'末端にATGを有し、その下流に該融合蛋白質をコードする領域、ついで翻訳終止コドンを含むDNA(プラスミド)は、化学合成で、あるいは遺伝子工学的に製造された公知の該蛋白質のcDNA、もしくは、染色体由来の

5 該蛋白質のDNAを加工することにより製造することができる。

本発明のN末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端にK i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを、従来のDNA技術、例えば特定部位指向性変異誘発技術を用いて目的のムテインをコードするDNAに変換することができる。

10 特定部位指向性変異誘発技術は周知であり、アール・エフ・レイサー(Lather, R. F.)及びジェイ・ピー・レコック(Lecoq, J. P.)、ジェネティック・エンジニアリング(Genetic Engineering)、アカデミックプレス社(1983年)第31-50頁に示されている。オリゴヌクレオチドに指示された変異誘発はエム・スミス(Smith, M.)及びエス・ギラム(Gillam, S.)、ジェネティック・
15 エンジニアリング:原理と方法、プレナムプムス社(1981年)3巻 1-32頁に示されている。

該融合蛋白質をコードする領域を含むDNAを含むプラスミドを製造するにあたって、ベクターとして用いられるプラスミドとしては、例えば大腸菌(Escherichia coli)由来のpBR322 [ジーン(Gene), 2, 95(1977)], pBR313 [ジーン, 2, 75(1977)], pBR324, pBR325 [ジーン, 4, 124(1978)], pBR327, pBR328 [ジーン, 9, 287(1980)], pBR329 [ジーン, 17, 79(1982)], pKY2289 [ジーン, 3, 1(1978)], pKY 2700 [生化学, 52, 770(1980)], pACYC177, pACYC184
25 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(Journal of Bacteriology), 134, 1141(1978)], pRK248, pRK646, pDF [メソッズ・イン・エンジーモロジー(Methods in Enzymology), 68, 268(1979)], pUC18, pUC19 [ヤニシューペロンら, ジーン(Gene), 33, 103(1985)]などがあげられる。また、バクテリオファージ、例えばλファージ

を使用した λ gt系の λ gt $\cdot\lambda$ C [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 4579 (1974)], λ gt $\cdot\lambda$ B [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3461 (1975)], λ Dam [ジーン, 1, 255 (1977)] やシャロンベクター [サイエンス, (Science), 196, 161 (1977); ジャーナル・オブ・ビーロロジ (Journal of Virology), 29, 555 (1979)], 繊維状ファージを使用したmp系のmp18, mp19 [ヤニシューペロンら, ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] ベクターなどもあげられる。

上記DNAは、ATGの上流にプロモーターを有しているのが好ましく、該プロモーターは、形質転換体の製造に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば大腸菌 (*Escherichia coli*) ではtrpプロモーター, lacプロモーター, rec Aプロモーター, λ PLプロモーター, lppプロモーター, T7プロモーターなど、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) ではSPO1プロモーター, SPO2プロモーター, penPプロモーターなど、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ではPHO5プロモーター, PGKプロモーター, GAPプロモーター, ADHプロモーターなど、動物細胞ではSV40由来のプロモーターなどがあげられる。必要によりSD (シャインアンドダルガーノ) 配列をプロモーターの下流に挿入してもよい。

T7プロモーターの系を用いる場合には、T7プロモーターとしては、T7 DNA上で見い出されている17種のプロモーター [J. L. Oakley ら, Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A, 74:4266-4270 (1977), M. D. Rosa, Cell 16:815-825 (1979), N. Panayotatos ら, Nature, 280:35 (1979), J. J. Dunn ら, J. Mol. Biol., 166:477-535 (1983)] のいずれでもよいが ϕ 10プロモーター [A. H. Rosenberg ら, Gene, 56:125-135 (1987)] が好ましい。

転写ターミネーターとしては、大腸菌の系で作動するターミネーター、好ましくはT ϕ ターミネーター [F. W. Studier ら, J. Mol. Biol., 189:113-130 (1986)] が用いられる。

T7 RNAポリメラーゼ遺伝子としてはT7遺伝子 [F. W. Studier ら,

J. Mol. Biol., 189: 113-130 (1986)] をあげることが出来る。

ベクターは上記ベクターにT7プロモーター、T7ターミネーターを組み込んで構築されるのが好ましく、このようなベクターとしては、pET-1, pET-2, pET-3, pET-4, pET-5 [A. H. Rosenberg, Gene 56: 125-135 (1987)]、pTB960-2 [EP-A-499990]などをあげることができるが、好ましくはpTB960-2が用いられる。

本発明の形質転換体は、上記方法で得られる発現用プラスミドを自体公知の方法 [例、コーエンS, N, ら, プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 69, 2110 (1972)] で宿主を形質転換することにより製造することができる。

形質転換される微生物の宿主としては、例えば、エシエリシア (Escherichia) 属菌、バチリス (Bacillus) 属菌、酵母、動物細胞などがあげられる。

上記エシエリシア属菌の例としては、エシエリシア・コリ (E. coli) があげられ、具体的にはエシエリシア・コリ (Escherichia coli) K12 DH1 [プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 60, 160 (1968)], JM-103 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41, 459 (1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)], N4830 [セル (Cell), 25, 713 (1981)], K-12 MM294 [プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス, 73, 4174 (1976)] BL-21などがあげられる。

上記バチルス属菌としては、例えばバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) があげられ、具体的にはバチルス・サチルス MI114 (ジーン, 24, 255 (1983)), 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95, 87 (1984)] などがあげられる。

上記酵母としては、例えばサッカロマイセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) があげられ、具体的には、サッカロマイセス・セレビシアエ AH 22 [Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 75, 1929 (1978)], X S B 5 2-23 C [Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 77 2173 (1980)], BH-641A (ATCC 28339), 20 B-12 [Genetics, 85, 23 (1976)], GM3C-2 [Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 78 2258 (1981)] などがあげられる。

動物細胞としては、例えばサル細胞 COS-7 [セル (Cell), 23, 175 (1981)], Vero [(日本臨床 21, 1209 (1963)], チャイニーズハムスター細胞 CHO [ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン (J. Exp. Med.), 108, 945 (1985)], マウス L 細胞 [ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート (J. Nat. Cancer Inst.), 4, 165 (1943)], ヒト FL 細胞 [プロシーディングス・オブ・ザ・ソサエティ・フォー・エクスperimental・バイオロジー・アンド・メディシン (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.), 94, 532 (1957)], ハムスター C 細胞などがあげられる。

T7 プロモーターの系を用いる場合には、その形質転換体の宿主としては、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子 (T7 遺伝子 1) [F. W. Studier ら, J. Mol. Biol. 189: 113-130 (1986)] を組み込んだ大腸菌株、例えば MM294, DH-1, C600, JM109, BL21, あるいは T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子 (T7 遺伝子 1) を他のプラスミドと共に組込んだ大腸菌株などが用いられる。好ましくは T7 遺伝子 1 を組み込んだ λ ファージが溶原化した MM294 株および BL21 株が用いられる。この場合 T7 遺伝子 1 のプロモーターとしては、イソプロピルー 1-チオー β -D-ガラクトピラノシド (IPTG と略することがある。) で発現が誘導される lac プロモーターが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 69 巻, 2110 (1972) やジ

ーン (Gene) , 17 巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 5 バチルス属菌を宿主として形質転換するには、例えばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular and General Genetics), 168, 111(1979)など公知の方法に従って行なうことができる。

酵母菌を宿主として形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75, 1929(1978)などの公知の方法に従って行なうことができる。

- 10 動物細胞を宿主として形質転換するには、例えば、ヴィーロロジー (Virology, 52, 456(1973)などの公知の方法に従って行なうことができる。

融合蛋白は、上述の形質転換体を培地に培養し、産生された融合蛋白を採取することにより製造することができる。

培地のpHは約6～8が望ましい。

- 15 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972)] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例え
20 ば3β-インドリル アクリル酸やイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 25 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 77, 4505(1980)] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが

好ましい。培養は通常約20～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば約0.2～20%好ましくは約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science), 122, 501(1952)〕, DME培地〔ヴィロロジー(Virology), 8, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)〕などがあげられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃、培養時間は約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

融合蛋白質は、上記形質転換体を培養し、培養物中に該融合蛋白質を生成、蓄積せしめ、これを採取することにより製造することができる。

培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー, J., エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Experiments in Molecular Genetics), 431-433 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972)〕, 2×YT培地〔メシング, メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 101, 20(1983)〕LB培地などがあげられる。

培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えてもよい。

λcItsリプレッサーと、λPL-プロモーターを含有する発現ベクターとを有する組換え体を使用する場合には、培養は約15～36℃好ましくは約30～36℃の温度で行い、λcItsリプレッサーの不活化は約37～42℃で行うのが好ましい。またrecAプロモーターをより効率良く働かせるため、すなわちrecA遺伝子発現抑制機能を低下せしめるため、必要によりマイトマイシンC, ナルジキシン酸などのような薬剤を添加したり、紫外線を照射する、あるいは培養液のpHをアルカリ側に変化させてもよい。

T7プロモーターの系を用いている場合には、(1)lacプロモーターの下流に連結されているT7遺伝子(RNAポリメラーゼ遺伝子)を発現させる時はIPTGなどを添加する、もしくは(2) λ P_Lプロモーターの下流に連結されているT7遺伝子(RNAポリメラーゼ遺伝子)を発現させる時は培養の温度を上昇させることなどにより、生成するT7ファージRNAポリメラーゼ1により特異的にT7プロモーターを作動させる。

培養後、公知の方法で菌体を集め、例えば緩衝液に懸濁したのち、例えば、蛋白変性剤処理、超音波処理やリゾチームなどの酵素処理、ガラスビーズ処理、フレンチプレス処理、凍結融解処理などを行って菌体を破碎し、遠心分離など公知の方法によって上清を得る。

上記により得られた上清から、融合蛋白質を単離するには、通常知られている蛋白質の精製法に従えばよい。例えば、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、電気泳動等を適切に組み合わせて行うことができる。また、該融合蛋白質は、精製することなく、あるいは部分精製の状態で、次の反応工程に進んでもよい。

次に、このようにして得られる融合蛋白質やペプチドをシステイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付す。該切断反応としては、例えば、S-シアノ化反応次いで加水分解反応があげられる。Kiss-1ペプチドのアミドまたはその塩を最終物として得る場合には、該切断反応としては、例えば、S-シアノ化反応次いでアンモノリシスを行うことがあげられる。該S-シアノ化反応は、原料化合物に、S-シアノ化試薬を作用させることにより行なう。

S-シアノ化試薬としては例えば2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(NTCB)、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジウム塩(DMAP-CN)、CN⁻イオンなどがあげられる。該S-シアノ化試薬の量は、モル数で全チオール基の約2倍から50倍量であればよく、好ましくは約5倍~10倍量である。

反応温度は約0~80℃の間であれば、いずれでもよく、約0~50℃の

間がより好ましい。用いる溶媒としては、S-シアノ化試薬と反応しないものであれば、いずれの緩衝液でもよいが、例えば、トリス-塩酸緩衝液、トリス-酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、などがあげられる。また、有機溶媒は、S-シアノ化試薬と反応しないものであれば、存在していてもよい。

該反応は、pH 1～12の間で行なうのが良い。特に、NTCBを用いる場合にはpH 7～10、DMAP-CNを用いる場合にはS-S交換反応を防止するため、pH 2～7の間が好ましい。また、反応液中には、塩酸グアニジン等の変性剤が存在していてもよい。

- 10 上記アンモノリシスまたは加水分解反応としては、例えばアルカリ処理に付すことがあげられる。

該アルカリ処理としては、原料化合物を含有する水溶液のpHを7～14に、調整することにより行なわれる。

- 15 該pHの調整は、例えばアンモニア、水酸化ナトリウム、アミノ化合物、トリツマベース（トリス〔ヒドロキシメチル〕-アミノメタン）、リン酸第2ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム等の溶液を原料化合物を含有する水溶液に適当量加えて行うが特にアンモニアなどが好ましい。

- 20 上記反応の際の溶液の濃度としては、たとえばアンモニアまたはアミノ化合物の場合は約0.01～1.5N好ましくは約0.1～3N、水酸化ナトリウムの場合は約0.01～2N好ましくは約0.05～1N、トリツマベースの場合は約1mM～1M好ましくは約20mM～200mM、リン酸第2ナトリウムの場合は約1mM～1M好ましくは約10mM～100mM、水酸化カリウムの場合は約0.01～4N好ましくは約0.1～2Nがあげられる。反応温度は約-20～80℃の間であればいずれでもよく、約-10～50℃の間が
- 25 より好ましい。

反応時間は、好ましくは、S-シアノ化反応は約1～60分好ましくは約15～30分が、加水分解反応は約5分～100時間好ましくは10分～15時間が、アンモノリシスは約5分～24時間好ましくは約10～180分があげられる。

該アミノ化合物としては、例えば、式 $R^1-(NR^2)-H$ (式中、 R^1 および R^2 は同一または異なつて、(i)水素原子、(ii) C_{1-20} アルキル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、 C_{6-14} アリール(aryl)基または C_{6-14} アリール- C_{1-3} アルキル基(これらは置換基を有していないかあるいは1~3個のアミノ基、
5 水酸基などを炭素原子上に有していてもよい)、(iii)置換されていてもよいアミノ基、(iv)水酸基または C_{1-6} アルコキシ基を示す。)で表される化合物などがあげられる。

上記のS-シアノ化およびアンモノリシスまたは加水分解により、〔図1〕に示される反応が起こると考えられる。

10 本発明の製造法で得られるK i S S-1ペプチドのC末端は、前記したようにアミド($-CONH_2$)、カルボキシル基、カルボキシレート($-COO^-$)、アルキルアミド($-CONHR$)またはエステル($-COOR$)であってもよく、なかでもアミド、カルボキシル基($-COOH$)またはアルキルアミドが好ましく、特にアミドまたはアルキルアミドが好適である。具体的には、本発明の製造法で得られ
15 るK i S S-1ペプチドのC末端は、〔図1〕に示される $-CO-X$ であつてよい。Xは $R^1-(NR^2)-$ (式中、各記号は前記と同意義を示す。)またはOHを示す。

上記 C_{1-20} アルキルの例としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、オクチル、
20 ノナニル、デカニル、ウンデカニル、ドデカニル、テトラデカニル、ペンタデカニル、ヘキサデカニル、ヘプタデカニル、オクタデカニル、ノナデカニルおよびエイコサニルなどがあげられる。

上記 C_{3-8} シクロアルキルの例としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチルなどがあげられる。
25

上記 C_{6-14} アリールの例としては、フェニル、ナフチル、アンスリル、フェナンスリル、アセナフチレニルなどがあげられる。

上記 C_{6-14} アリール- C_{1-3} アルキルの例としては、例えばベンジル、フ

エネチル, 3-フェニルプロピル, (1-ナフチル)メチル, (2-ナフチル)メチルなどがあげられる。

上記C₁₋₆アルコキシの例としては、例えばメトキシ, エトキシ, プロポキシ, ブトキシ, ペンチルオキシ, ヘキシルオキシなどがあげられる。

- 5 上記(iii)の置換されていてもよいアミノの置換基の例としては、例えばアミノ酸, 2~10個のアミノ酸からなるペプチドなどがあげられる。

上記アミノ酸としては、L-体でもD-体でもよく、その例としては、例えば, Ala, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Met, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val などがあげられる。

- 10 上記ペプチドの例としては、例えば, H-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅, H-Val-Ala-Leu-D-Ala-Ala-Pro-Leu-Ala-Pro-Arg-OH などがあげられる。

上記した中でも、R²としては水素原子、R¹としては水素原子またはC₁₋₂₀アルキル基が好ましい。

- 15 該アンモノリシス反応において、アンモニアまたはアミノ化合物を用いた場合には、対応するアミド体を得られる。

- 20 切り出された目的ペプチドを単離するには、通常知られているペプチドの精製法に従えばよい。例えば、ゲル濾過法, イオン交換クロマトグラフィー, 高速液体クロマトグラフィー, アフィニティークロマトグラフィー, 疎水クロマトグラフィー, 薄層クロマトグラフィー, 電気泳動等を適宜組み合わせて行うことができる。

- 25 このようにして得られるK i S S-1 ペプチドまたはその塩は、公知の精製手段、例えば、抽出、塩析、分配、再結晶、クロマトグラフィーなどにより、反応溶液から単離・精製することもできるが、好ましい例として、例えば、S P-セファロース (ファルマシア バイオテック(株))、D E A E-5 P W (東ソー(株))、あるいはS P-5 P W (東ソー(株))を介したイオン交換クロマトグラフィーなどによる精製法があげられる。

得られるK i S S-1 ペプチドまたはその塩は、必要によりこれを凍結乾燥により粉末とすることもできる。凍結乾燥に際しては、ソルビトール, マンニトール, デキストロース, マルトース, トレハロース, グリセロールな

どの安定化剤を加えることができる。

- 本発明の方法で製造されるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は滅菌水、ヒト血清アルブミン(H S A)、生理食塩水その他公知の生理学的に許容される担体と混合することができ、哺乳動物(例、ヒト)に対して非経口的に又は局所に投与することができる。たとえば、その1日投与量は1人あたり、
- 5 約0.01mg-50mg、好ましくは、約0.1mg-10mgを、静注または筋注などにより非経口的に投与することができる。

- 本発明の方法で製造されるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩を含有する製剤は、塩、希釈剤、アジュバント、他の担体、バッファー、結合剤、界面
- 10 活性剤、保存剤のような生理的に許容される他の活性成分も含有していてもよい。非経口的投与製剤は、滅菌水溶液又は生理学的に許容される溶媒との懸濁液アンプル、または生理学的に許容される希釈液で用時希釈して使用しうる滅菌粉末(通常ペプチド溶液を凍結乾燥して得られる)アンプルとして提供される。

- 15 本発明の製造法によって得られるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌(例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等)の予防または治療薬として有用である。

- また、K i S S - 1 ペプチドまたはその塩は胎盤機能調節作用を有するため、
- 20 絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬として有用である。

- なお、本発明の製造法において、K i S S - 1 ペプチドを他の目的成熟ペプチドに代え、さらにN末端にシステインを有する低分子ペプチドを当該目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドに代えることによ
- 25 って、同様にして、目的成熟ペプチドを製造することができる。

他の目的成熟ペプチドとしては、例えば、約10~200個、好ましくは約10~100個程度のアミノ酸残基を含有するペプチドなどが用いられる。

当該目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドとしては、当該目的成熟ペプチドを含む前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドであつ

て、当該目的成熟ペプチドのC末端アミノ酸残基に隣接するアミノ酸残基から始まるアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、当該目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドとしては、例えば、当該目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の約10
5 ～50個、好ましくは約20～40個、さらに好ましくは約20～30個のアミノ酸残基を有する部分ペプチドが用いられる。

本明細書および図面において、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基、その他に関し略号で表示する場合、それらはIUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature)による略号あるいは当該分野における慣用略号に
10 基づくものであり、その例を次にあげる。また、アミノ酸などに関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
15	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	Gly	: グリシン
20	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
25	Thr	: スレオニン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン

	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニールアラニン
	Tyr	: チロシン
5	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
	Gln	: グルタミン
	Cys	: システイン
10	Asx	: アスパラギンまたはアスパラギン酸
	Glx	: グルタミンまたはグルタミン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

15 ヒトK i S S - 1 ペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

ヒトK i S S - 1 ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：3]

低分子ペプチドのアミノ酸配列を示す。

20 [配列番号：4]

低分子ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：5]

融合蛋白質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：6]

25 式 (I) で表される融合蛋白質をコードするDNAの断片の塩基配列 1 を示す。

[配列番号：7]

式 (I) で表される融合蛋白質をコードするDNAの断片の塩基配列 2 を示す。

[配列番号：8]

実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：9]

- 5 実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：10]

実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

- 10 [配列番号：11]

実施例1においてK i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：12]

実施例1において得られたDNA断片の塩基配列を示す。

- 15 [配列番号：13]

実施例1において得られたDNA断片の塩基配列を示す。

[配列番号：14]

実施例1において得られたDNA断片の塩基配列を示す。

[配列番号：15]

- 20 K i S S - 1 ペプチド前駆体のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：16]

マウスK i S S - 1 ペプチド前駆体（A）のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：17]

マウスK i S S - 1 ペプチド前駆体（B）のアミノ酸配列を示す。

- 25 [配列番号：18]

ラットK i S S - 1 ペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：19]

マウスK i S S - 1 ペプチド前駆体（A）をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：20]

マウスK i S S - 1 ペプチド前駆体 (B) をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：21]

- 5 ラットK i S S - 1 ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体*Escherichia coli* MM294 (DE3) / pTC2MetC24-1. 3は、2001年12月10日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7823として、2001年10月24日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16717して寄託されている。

10

実施例

- 15 以下に実施例をあげて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 C末端24アミノ酸付加K i S S - 1 ペプチドをコードするDNAの製造 (1)

(a) DNA断片の合成

- 20 [図1] に示す4種のDNA断片 (#1、#2 ; 5' リン酸化済, #3 ; 5' リン酸化済, #4 ; キコーテック社) (配列番号：8~11) を用いてK i S S - 1 ペプチドのC末端に付加 (24アミノ酸残基) する遺伝子を調製した。

(b) C末端付加用DNA断片の連結

- 25 上記a) で得られたDNA断片#1~#4を合わせ40 μ lとした。この混合液を65℃で10分間保った後、室温まで徐冷しアニーリングを行った。このアニーリング液のうち10 μ lについてT4 DNA Ligase (宝酒造) を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液10 μ lに 10倍濃縮添付Ligation バッファー2 μ lおよびT4 DNA ライゲース1 μ l (350ユニ

ット)を加えよく混合した後、16℃、17時間反応させ、ライゲーションを行った後、65℃で5分間の熱処理を行った。この様にして得られたDNA断片をT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造)によるリン酸化を行った後、1.8%低融点アガロースゲル電気泳動により96bpのDNA断片(配列番号:12)をELUTIP Minicolumn (S&S社)を用いて抽出し、20μlのTE緩衝液に溶解し、以下の(c)に供した。

(c) KiSS-1 遺伝子とC末端付加用DNAフラグメントの連結

KiSS-1 ペプチド発現ベクターpTFC-KiSS-1をNde I (宝酒造) およびXmn I (NEB社)で37℃、2時間消化した後、1.5%低融点アガロースゲル電気泳動により149bpのDNA断片(配列番号:13)をELUTIP Minicolumn (S&S社)を用いて抽出し、20μlのTE緩衝液に溶解した。このDNA断片と上記b)で得られたDNA断片をライゲーションした。149bpのDNA溶液20μlと96bpのDNA溶液10μlに10倍濃縮添付Ligation バッファー3.5μlおよびT4 DNA ライゲース1.5μl (525ユニット)を加えよく混合した後、16℃、17時間反応させた。ライゲーションを行った後、65℃で5分間の熱処理を行った。このライゲーション液を用いて全量350μlでNde IおよびBamHI消化を1時間行った後、エタノール沈殿によってDNA断片(配列番号:14)を回収し、以下の(d)に供した。

(d) C末端24アミノ酸付加KiSS-1 ペプチド発現ベクターの構築[図2]

発現用ベクターpTCIIをNde IおよびBamHI (宝酒造)で37℃、1時間消化した後、1%アガロースゲル電気泳動により4.6kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社)を用いて抽出し、25μlのTE緩衝液に溶解した。このpTCIIのNde I-BamHI断片と上記c)で得られたDNA断片をT4 DNA Ligase (宝酒造)を用いてライゲーション反応を行った。

この反応液を10μl用いて大腸菌JM109コンピテントセル(宝酒造)を形質転換し、10μg/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、

3 7℃で一晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニー選んだ。この形質転換体をLB培地で1晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン社) を用いてプラスミド pTC2MetC24 を調製した。このC末端24アミノ酸付加K i S S - 1 構造遺伝子部分の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル3100 DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミド pTC2MetC24 で大腸菌MM294 (DE3) を形質転換し、C末端24アミノ酸付加K i S S - 1 タンパク質発現株MM294 (DE3) / pTC2MetC24-1.3を得た。

(e) C末端24アミノ酸付加K i S S - 1 ペプチドの製造

MM294(DE3)/ pTC2MetC24-1.3 を5.0 mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地に1 L (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) を用いて2 L容フラスコ中で37℃、8時間振とう培養した。得られた培養液を19 Lの主発酵培地 (1.68%リン酸1水素ナトリウム、0.3%リン酸2水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.025%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第1鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸) を仕込んだ50 L容発酵槽へ移植して、30℃で通気攪拌を開始した。培養液の濁度が500クレット単位になったところで、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドの最終濃度が12 mg/Lになるように添加し、さらに6時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約430 gの湿菌体を取得し、-80℃で保存した。

実施例2

実施例1で得た菌体70 gに7 Mグアニジン塩酸塩、100 mMトリス緩衝液 1 mM EDTA (pH 8.0) 溶液210 mlを加え、攪拌溶解を行った後、遠心分離 (8000 rpm、60分) を行った。上澄液を4.2 Lの50 mM トリス緩衝液、0.2 M アルギニン pH 8.0、1 mM 還元型グルタチオン、0.1 mM 酸化型グルタチオンを含む溶液に希釈して低温室に一晩放置した。本溶液を1 M尿素溶液で4倍に希釈し、酢酸でpH 6.0に調整し、50 mM MES-NaOH緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した SP-Toyo pearl 550Cカラム (5 cm ID×20 cm L、東ソー) に750 m

- L/時間の流速で通液、吸着後、50 mM MES-NaOH緩衝液 0.2 M NaCl pH 6.0 で洗浄した後に 50 mM MES-NaOH緩衝液 0.5 M NaCl pH 6.0 で溶出した。この溶出液を蒸留水で3倍に希釈した後、50 mM MES-NaOH緩衝液 pH 6.0 で平衡化した SP-5
- 5 PW (21.5 mm ID×150 mm L、東ソー) に 5 mL/分の流速で通液、吸着した後 0-80% B (B = 1 M NaCl 50 mM MES-NaOH緩衝液 pH 6.0) の段階勾配で溶出を行い、KiSS-1-24 アミノ酸付加体画分をプールした。本溶出画分を 0.1% トリフルオロ酢酸で平衡化した C4P-50 (21.5 mm ID×300 mm L、昭和電工) に通液、吸着
- 10 した後 5 mL/分の流速で 20-70% B (B = 0.1% トリフルオロ酢酸 + 80% アセトニトリル) の段階勾配で溶出を行い、KiSS-1-24 アミノ酸付加体画分を得、凍結乾燥を行った。凍乾粉末を 0.1 M 酢酸 6 M 尿素溶液に溶解した後、DMAP-CN (1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate) 約 1.5 mg を加えて、室温で 15 分間反応した。反応終
- 15 了後、反応液を 50 mM リン酸 1 カリウムで平衡化した Sephadex G-25 カラム (2.5 cm ID×50 cm L、ファルマシア) に通液し、平衡化に用いた 50 mM リン酸 1 カリウムを 10 ml/分の流速で展開し、S-シアノ化された KiSS-1 ペプチド-24 アミノ酸付加体タンパク質画分を得た。この溶出液をセントリプラス (分画分子量 3 kDa: ミリポア社) で濃縮・脱
- 20 塩を行い、KiSS-1-24 アミノ酸付加体の脱塩液を得た。この脱塩液に最終濃度 6 M となるように尿素を添加した後、さらに、3 M アンモニア濃度となるように 25% アンモニア水を加え、室温で 15 分間反応した。反応終了後、酢酸で pH 6.0 に調整し、KiSS-1 ペプチドを得た。この反応液を 50 mM リン酸 1 カリウムで平衡化した Sephadex G-25 カラム (2.5 cm ID×50 cm L) に通液し、平衡化に用いた 50 mM リン酸 1 カリウムを 10 ml/分の流速で展開し、KiSS-1 ペプチド画分を得た。この画
- 25 分を、0.1% トリフルオロ酢酸で平衡化した C4P-50 (21.5 mm ID×300 mm L、昭和電工) に通液し、吸着、洗浄した後、5 mL/分の流速で 20-60% B (B: 80% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸)

の段階勾配で溶出を行い、K i S S - 1 ペプチド画分をプールした後、凍結乾燥を行い、K i S S - 1 ペプチド凍結乾燥粉末約 0. 3 5 mg を得た。

実施例 3 K i S S - 1 ペプチドの特徴の決定

a) アミノ酸組成分析

- 5 アミノ酸組成をアミノ酸分析計（日立 L - 8 5 0 0 A Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。その結果、K i S S - 1 ペプチドの DNA 塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した〔表 1〕。

〔表 1〕

10	アミノ酸	1 モル当たりの	K i S S - 1 ペプチドの塩基配列
		残 基 数	から予測される値
	A s x	3. 4	4
	T h r [*])	0. 9	1
	S e r [*])	7. 1	8
	G l x	7. 1	7
15	P r o	8. 2	8
	G l y	5. 1	5
	A l a	3. 0	3
	C y s	0	0
	V a l	1. 9	2
20	M e t	0	0
	I l e	1. 0	1
	L e u	5	5
	T y r	1. 0	1
	P h e	1. 9	2
25	H i s	1. 0	1
	L y s	1. 0	1
	A r g	3. 9	4
	T r p	0. 4	1

酸加水分解 (6N HCl-4%thioglycolic acid 24-48hr加水分解の平均値)

*) 0時間に外挿した値

b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (P E アプライドバイ
5 オシステムズ モデル492) を用いて決定した。その結果、K i S S - 1
ペプチドのDNA塩基配列から予想されるN末端アミノ酸配列と一致した
[表2]。

[表2]

N末端アミノ酸配列分析

10	残基 No.	検出された	KiSS-1ペプチドの塩基配列
		PTH*)-アミノ酸	から予測されるアミノ酸
	1	G l y (56)	G l y
	2	T h r (52)	T h r
15	3	S e r (41)	S e r
	4	L e u (45)	L e u
	5	S e r (33)	S e r
	6	P r o (28)	P r o
	7	P r o (34)	P r o
20	8	P r o (30)	P r o
	9	G l u (14)	G l u
	10	S e r (12)	S e r

100 pmolを用いた。

*) フェニールチオヒダントイン。

25 実施例4 生物活性測定

実施例2で取得したヒトK i S S - 1ペプチドを用いて、WO 99/339
76の実施例3に記載の方法 (細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性) で活性
を測定し、ヒト胎盤抽出液より精製した標品と同等の活性を有することを確認
した。

実施例 5 C末端 24 アミノ酸付加 K i S S - 1 ペプチドをコードする DNA の製造 (2)

実施例 1 (c) で用いた K i S S - 1 ペプチド発現ベクター pTFC-KiSS-1 に代えて、pTC2KiSS1 を用いることによっても、C末端 24 アミノ酸付加 K i S S - 1
5 ペプチド発現ベクター p T C 2 M e t C 2 4 - 1 . 3 を構築することができた
〔図 3〕。

産業上の利用可能性

本発明の製造方法を用いると、例えば、癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等）、さら
10 には絨毛癌、胎状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬などとして用いることができる K i s s - 1 ペプチドまたはその塩を工業的かつ大量に製造できる。

請求の範囲

1. N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、K i S S - 1
ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基
5 のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK i S S -
1 ペプチドまたはその塩の製造法。
2. N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、K i S S - 1
ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを有する
ベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはその
10 塩を発現させ、発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイ
ン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK i
S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法。
3. 製造されるK i S S - 1 ペプチドのC末端がアミドである請求項1 また
は2記載の製造法。
- 15 4. 切断反応がS-シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解反
応に付す反応である請求項1 または2記載の製造法。
5. K i S S - 1 ペプチドが配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有す
るペプチドである請求項1 または2記載の製造法。
6. K i S S - 1 ペプチドが、①配列番号：1 で表されるアミノ酸配列のN
20 末端から第40～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチド、②配列
番号：1 で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目からなるア
ミノ酸配列を有するペプチド、③配列番号：1 で表されるアミノ酸配列のN
末端から第46～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチドまたは④
配列番号：1 で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目からな
25 るアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1 または2記載の製造法。
7. N末端にシステインを有する低分子ペプチドが、N末端にシステインを
有し、約10～約50個のアミノ酸残基からなるペプチドである請求項1 ま
たは2記載の製造法。
8. 低分子ペプチドが、K i S S - 1 ペプチドを含む前駆体蛋白質のC末端

側の部分ペプチドであって、該K i S S - 1 ペプチドのC末端アミノ酸に隣接するアミノ酸残基から始まるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1または2記載の製造法。

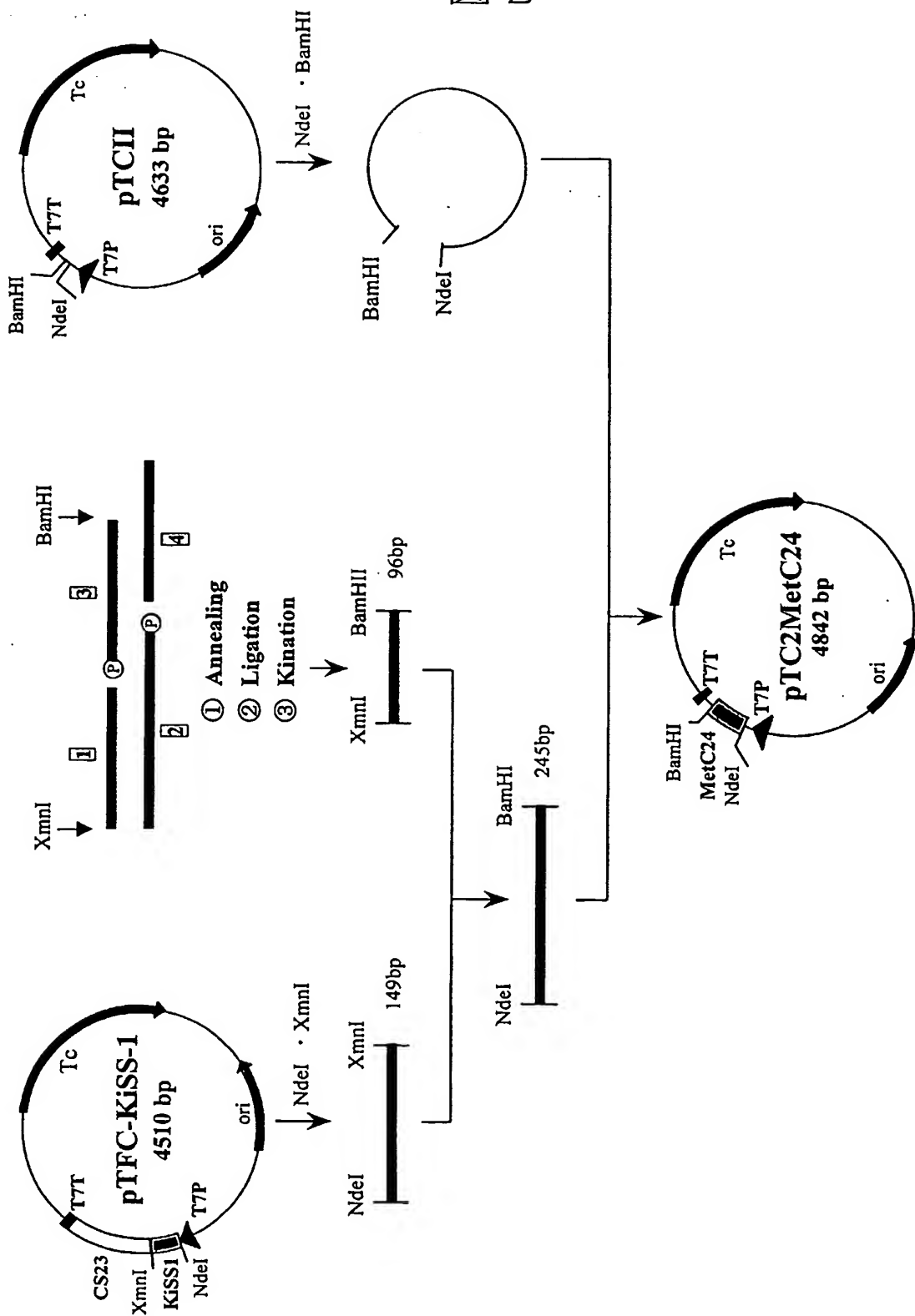
9. N末端にシステインを有する低分子ペプチドが、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加したペプチドである請求項1または2記載の製造法。
10. N末端にシステインを有する低分子ペプチドが配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加したペプチドであり、K i S S - 1 ペプチドが配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドであり、製造されるK i S S - 1 ペプチドのC末端がアミドである配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項1または2記載の製造法。
11. N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩。
12. 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有する請求項11記載の融合蛋白質、ペプチドまたはその塩。
13. 請求項11記載の融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを含有するDNA。
14. ①配列番号：6で表される塩基配列または②配列番号：7で表される塩基配列を有する請求項13記載のDNA。
15. 請求項13記載のDNAを有するベクター。
16. 請求項15記載のベクターを含有する形質転換体。
17. FERM BP-7823で表示されるエシュリヒア・コリMM294 (DE3) / pTC2MetC24-1.3。

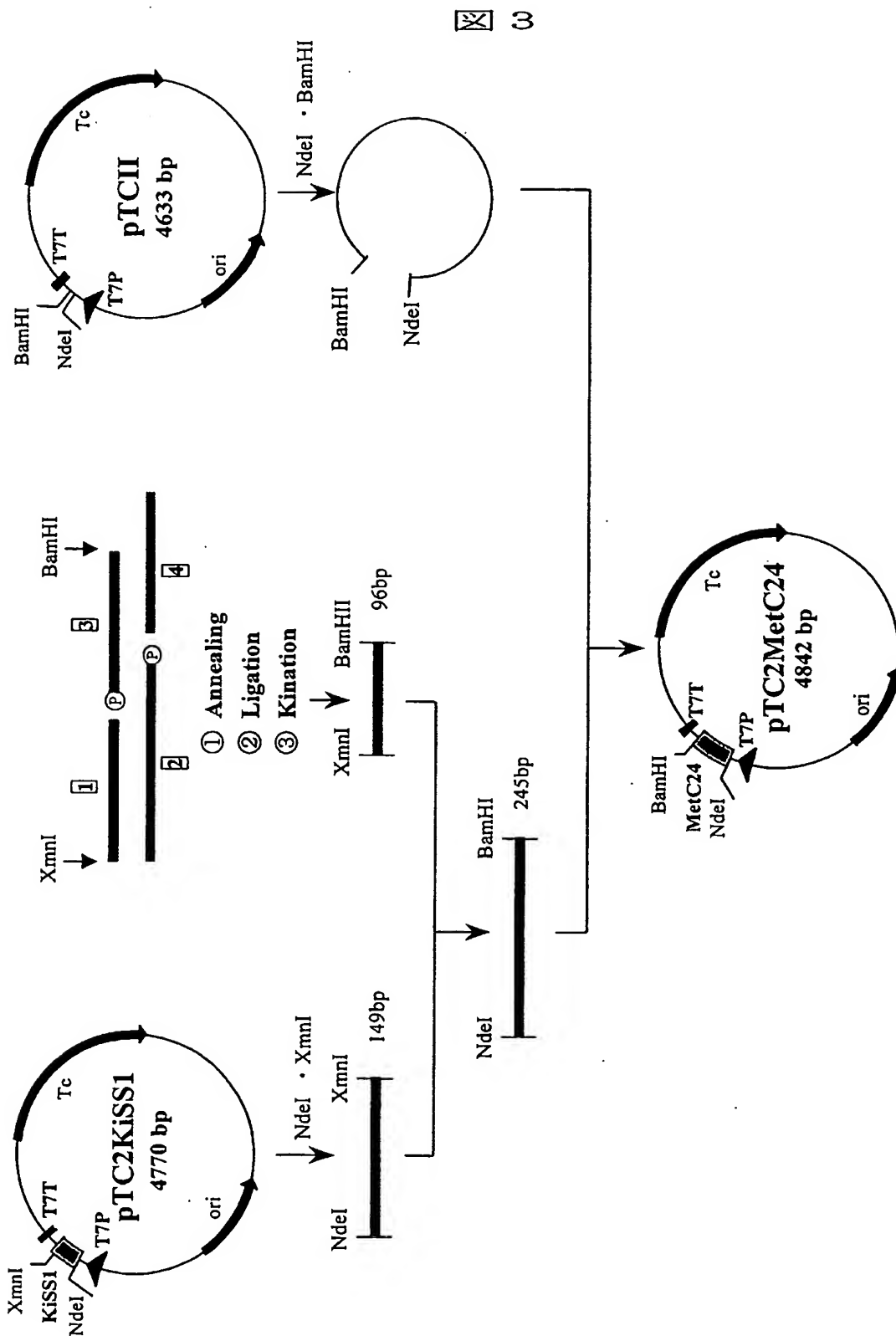
1/3

☒ 1

1 5' -CTTTCGGTCTGCGTTTCTGCGGTAAACGTGAAGCTGCTCCGG -3'
2 5' P-GTTACCCGGAGCAGCTTCACGTTTACCGCAGAAACGCAGACCGAAAG -3'
3 5' P-GTAACCAACGGTCGTTCTGCTGGTCGTTGGGGTGGTGGTGCAGTGAG -3'
4 5' -GATCCTCACTGACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCGTG -3'

2





SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Method of Production for KiSS-1 peptide

<130> 3013W00P

<150> JP 2002-005180

<151> 2002-01-11

<160> 21

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Human

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH₂) form

<400> 1

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

1 5 10 15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly

20 25 30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn

35 40 45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe

50 54

<210> 2

<211> 162

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

gg tacttctc tgtctccgcc gccggaatct tctggttctc gtcagcagcc gggctctgtct 60

gctccgcact ctcgtcagat cccggctccg cagggtgctg ttctggttca gcgtgaaaaa 120

gacctgccga actacaactg gaactctttc ggtctgcgtt tc 162

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro Gly Asn His Gly Arg Ser Ala Gly Arg

1 5 10 15

Gly Trp Gly Ala Gly Ala Gly Gln

20 24

<210> 4

<211> 72

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

ggtaaactg aagctgctcc gggtaccac ggtcgttctg ctggctgtgg ttggggtgct 60

ggtgctggtc ag 72

<210> 5

<211> 79

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

1 5 10 15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly

20 25 30
Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn
35 40 45
Ser Phe Gly Leu Arg Phe Cys Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro Gly Asn
50 54 55 56 60
His Gly Arg Ser Ala Gly Arg Gly Trp Gly Ala Gly Ala Gly Gln
65 70 75 79

<210> 6

<211> 237

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

ggtaacttctc tgtctccgcc gccggaatct tctggttctc gtcagcagcc gggctctgtct 60
gctccgcact ctcgtcagat cccggctccg cagggtgctg ttctggttca gcgtgaaaaa 120
gacctgccga actacaactg gaactctttc ggtctgcggtt tctgcggtaa acgtgaagct 180
gctccgggta accacggctcgt ttctgctggt cgtggttggg gtgctggtgc tggtcag 237

<210> 7

<211> 237

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

ggtaacttctc tgtctccgcc gccggaatct tctggttctc gtcagcagcc gggctctgtct 60
gctccgcact ctcgtcagat cccggctccg cagggtgctg ttctggttca gcgtgaaaaa 120
gacctgccga actacaactg gaactctttc ggtctgcggtt tctgtggttaa acgtgaagct 180
gctccgggta accacggctcgt ttctgctggt cgtggttggg gtgctggtgc tggtcag 237

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

ctttcgggtct gcgtttctgc ggtaaactgt aagctgctcc gg

42

<210> 9

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

gttaccgga gcagcttcac gttaccgca gaaacgcaga ccgaaag

47

<210> 10

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

gtaaccacgg tcgttctgct ggtcgtggtt ggggtgctgg tgctggtcag tgag

54

<210> 11

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

gatactcact gaccagcacc agcaccceaa ccacgaccag cagaacgacc gtg 53

<210> 12

<211> 96

<212> cDNA

<213>

<400> 12

ctttcgggtct gcgtttctgc ggtaaactgt aagctgctcc gggaaccac ggtcgttctg 60

ctggctcgtgg ttgggggtgct ggtgctggtc agtgag 96

<210> 13

<211> 149

<212> cDNA

<400> 13

tatgggtact tctctgtctc cgccgccgga atcttctggt tctcgtcagc agccgggtct 60

gtctgtccg cactctcgtc agatcccggc tccgcagggt gctgttctgg ttcagcgtga 120

aaaagacctg ccgaactaca actggaact 149

<210> 14

<211> 245

<212> cDNA

<400> 14

tatgggtact tctctgtctc cgccgccgga atcttctggt tctcgtcagc agccgggtct 60

gtctgtccg cactctcgtc agatcccggc tccgcagggt gctgttctgg ttcagcgtga 120

aaaagacctg ccgaactaca actggaactc tttcggctctg cgtttctgcg gtaaactga 180

agctgtccg ggtaaccacg gtcgttctgc tggctgtggt tgggggtctg gtgctggtca 240

gtgag 245

<210> 15

6/10

<211> 145

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Met Asn Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu Phe Leu Cys Ala Thr

1 5 10 15

His Phe Gly Glu Pro Leu Glu Lys Val Ala Ser Val Gly Asn Ser Arg

20 25 30

Pro Thr Gly Gln Gln Leu Glu Ser Leu Gly Leu Leu Ala Pro Gly Glu

35 40 45

Gln Ser Leu Pro Cys Thr Glu Arg Lys Pro Ala Ala Thr Ala Arg Leu

50 55 60

Ser Arg Arg Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser

65 70 75 80

Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala

85 90 95

Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr

100 105 110

Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro

115 120 125

Gly Asn His Gly Arg Ser Ala Gly Arg Gly Trp Gly Ala Gly Ala Gly

130 135 140

Gln

145

<210> 16

<211> 152

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 16

Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys

5

10

15

Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser

20

25

30

Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu

35

40

45

Ala Lys Val Ala Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu

50

55

60

Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro

65

70

75

80

Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro Cys Pro Pro Val

85

90

95

Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala Ser Arg Ser Arg

100

105

110

Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp

115

120

125

Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg

130

135

140

Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly

145

150

<210> 17

<211> 156

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 17

Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys

5

10

15

Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser

20

25

30

Trp Gln Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu

35

40

45

Ala Lys Val Ala Pro Leu Val Lys Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser

50

55

60

Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala

65

70

75

80

Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro

85

90

95

Cys Pro Pro Val Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala

100

105

110

Ser Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln

115

120

125

Arg Glu Lys Asp Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg

130

135

140

Tyr Gly Arg Arg Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly

145

150

155

<210> 18

<211> 130

<212> PRT

<213> Rat

<400> 18

Met Thr Ser Leu Ala Ser Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala

5

10

15

Ser Phe Gly Glu Pro Leu Ala Lys Met Ala Pro Val Val Asn Pro Glu
20 25 30
Pro Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Gln
35 40 45
Lys Gly Pro Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro Gly Ala Ala Gly Leu Arg
50 55 60
Ala Arg Arg Thr Ser Pro Cys Pro Pro Val Glu Asn Pro Thr Gly His
65 70 75 80
Gln Arg Pro Pro Cys Ala Thr Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg
85 90 95
Gly Ser Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Met Ser Ala Tyr Asn Trp
100 105 110
Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg Gln Val Ala Arg Ala Ala
115 120 125

Arg Gly

130

<210> 19

<211> 449

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 19

atgtatctga gatttggcgt tgatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60
ctgccccttc ctcccagaat tctcaatggc ttcttggcag ctgctgcttc tcctctgtgt 120
cgccacctat ggggagccgc tggcaaaagt gaagcctgga cacaggccag cagtccggac 180
cccaggaact cgттаатgcc tgggaaaagg aatcgcggtg tgcagagagc aagcctgggt 240
gcagggctgc gcgctcgtag gtcgtcgcca tgcccgcggg ttgagggccc cgcggggcgc 300
cagcgggccc tgtgtgcctc gcagtcgcct gatccctgcg ccccgcggag cgggtgctggt 360

gcagcgggag aaggacctgt ccacctacaa ctggaactcc cggcctgcgc tacggcagga 420

ggcaggcggc gcgggcagca cggggctga 449

<210> 20

<211> 458

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 20

atgtatctga gatttggcgt tgatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60

ctgccccttc ctcccagaat tctcaatggc ttcttggcag ctgctgcttc tcctctgtgt 120

cgccacctat ggggagccgc tggcaaaagt ggcacctttg gaagcctgga tccacaggcc 180

agcagtccgg accccaggaa ctcgttaatg cctgggaaaa ggaatcgcg gttgcagaga 240

aagcctgggt ctgcagggt gcgcgtcgt aggtcgtcgc catgcccgcc ggttgagggc 300

cccgcggggc gccagcgcc tgtgtgcctc ccgcagtcgc ctgatccctg cgcccccgcg 360

agcgggtctg gtgcagcggg agaaggacct gtcgacctac ctggaactcc ttcggcctgc 420

gctacggcag gaggcaggcg gcgcgggcag cacggggc 458

<210> 21

<211> 390

<212> DNA

<213> Rat

<400> 21

atgacctgc tggtttcttg gcagctgctg cttctcctct gtgtggcctc ttttggggag 60

ccactggcaa aaatggcacc tgttgtgaac cctgaacca caggccaaca gtccggaccc 120

caggaaactcg ttaatgcctg gcaaaagggc ccgcggtatg cagagagcaa gcctggggct 180

gcaggactgc gcgctgcgcg aacatcgcca tgcccgccgg tggagaacct cacggggcac 240

cagcggtccc cgtgtgccac ccgcagtcgc ctgatccctg cgcccccgcg atcgggtctg 300

gtgcagcgcg agaaggacat gtcagcctac aactggaact ctttggcct gcgctacggc 360

aggaggcagg tggcgcgggc ggcacggggc 390

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/00113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K19/00, C12N1/21 //
(C12P21/02, C12R1:19), (C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K19/00, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/44469 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 21 June, 2001 (21.06.01), & AU 1889101 A	1-17
Y	EP 887417 A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 30 December, 1998 (30.12.98), & CA 2242086 A & JP 11-71396 A	1-17
Y	EP 499990 A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 26 August, 1992 (26.08.92), & US 5861284 A & JP 5-304976 A	1-17
Y	WO 00/24890 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 04 May, 2000 (04.05.00), & EP 1126028 A	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
01 April, 2003 (01.04.03)Date of mailing of the international search report
22 April, 2003 (22.04.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/00113

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/75104 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 11 October, 2001 (11.10.01), & AU 4460901 A	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K19/00, C12N1/21 // (C12P21/02, C12R1:19), (C12N1/21, C12R1:19)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K19/00, C12N1/21		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/44469 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 2001.06.21 & AU 1889101 A	1-17
Y	EP 887417 A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 1998.12.30 & CA 2242086 A & JP 11-71396 A	1-17
Y	EP 499990 A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 1992.08.26 & US 5861284 A & JP 5-304976 A	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01.04.03	国際調査報告の発送日 22.04.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9359

C. (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 00/24890 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 2000.05.04 & EP 1126028 A	1-17
Y	WO 01/75104 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 2001.10.11 & AU 4460901 A	1-17

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.